



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Clinical genetics of Type 1 Diabetes Genetic correlates of early growth and disease progression

Kharagjitsing, A.V.

Citation

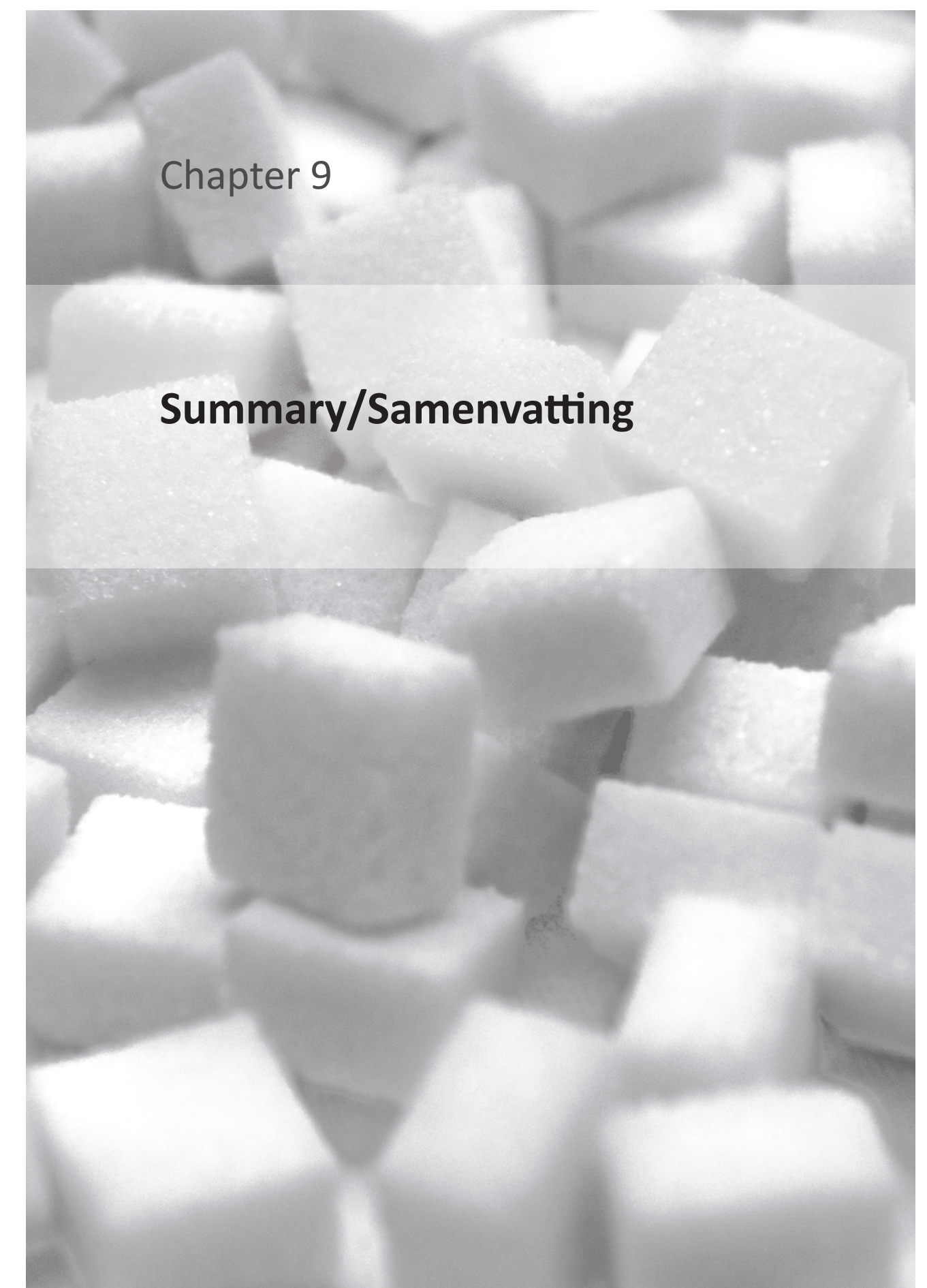
Kharagjitsing, A. V. (2011, November 30). *Clinical genetics of Type 1 Diabetes Genetic correlates of early growth and disease progression*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18158>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18158>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

A close-up, black and white photograph of numerous sugar cubes. The cubes are piled together, with some in sharp focus in the foreground and others blurred in the background, creating a sense of depth. The lighting highlights the granular texture of the sugar.

Chapter 9

Summary/Samenvatting

Summary

Background

Several years ago we embarked on a journey, aiming to identify the molecular mechanisms of candidate risk genes for type 1 diabetes (T1D) focusing on their role in disease pathogenesis. In this context, we studied phenomena of T1D with clinical relevance in great detail and aimed to find genetic correlates of these. This thesis can be considered the clinical chapter of this journey providing validation and extension of several clinically relevant gene polymorphisms with functional consequences in relation to growth (INS-VNTR, IGF1) [chapter 2 to 4], disease progression and remission (IFN- γ , IL-10,) [chapter 5 and 6], islet autoimmunity (INS-VNTR) [chapter 3], and environment (Lewis) [chapter 7].

Early growth

Chapter 2 is an extension of earlier work, in which early growth was shown to be increased in prediabetic children. The aim of this chapter was to validate and study early increased growth prior to later diabetes onset in childhood, by applying a novel and unique analysis method in an extended family cohort.

Interestingly, we found that accelerated growth in prediabetic children was higher when compared with the non affected sibling and, that this accelerated growth was limited to the first year of life, implying that increased growth beyond the first year could be attributed to familial growth patterns, rather than predisposition to T1D per se. We also established a correlation between age at disease onset and increased weight in the first six months of life.

Chapter 3 describes the findings in the quest to attain genetic correlates for *early increased growth prior to T1D*. We selected 2 genetic markers known to be important in both growth and T1D. Correlations between the two gene variants: – an IGF1 variant, as earlier identified by our group, and the known T1D “protective” INS-VNTR class 3 variant-, and first year growth were studied in our family cohort.

The IGF1 variant correlated with accelerated growth in the first year of life in both patients and their healthy siblings. First year growth did not correlate with the INS-VNTR variant in patients in contrast to their siblings.

In **Chapter 4** we explored whether the INS-VNTR and IGF1 gene variants have comparable functionality in a population characterised by early accelerated growth per se, i.e. showing catch up growth. This was done in a cohort of 250 infants born very premature (gestational age below 32 weeks) in which early growth was studied. Functionality of the IGF1 variant was confirmed, although this was in evidence with regard to infant head circumference and to a lesser extent for early growth, showing a non significant trend. The INS-VNTR variant similarly showed no association with parameters of growth.

Disease progression, remission or the honeymoon phase

The honeymoon (or remission) phase, is defined as the period in which reduction in insulin demand occurs after initial treatment with insulin at clinical diagnosis. This period remains an ill defined phase in which disease progression or (partial) remission can be studied. It is therefore

a pivotal period and understanding it will create great opportunities for innovation in a new era of therapeutic strategies.

In **Chapter 5 and 6**, in an effort to further unravel the pathophysiology of the remission phase, the cytokine profiles (levels) and their corresponding functional polymorphic genotypes were studied in an international cooperation of new onset T1D patients, aiming to identify genetic and functional immunocorrelates, associated with disease progression.

In **Chapter 5** the question was whether serum interferon (IFN)- γ or interleukin (IL)-10 levels and their corresponding functional polymorphic genotypes are associated with partial remission of type 1 diabetes (T1D). This was analysed in an international case control cohort. The patients were followed for 3 months and characterized based on their remission status. Remarkably, those patients with the most outspoken pattern of remission showed low serum IFN- γ concentrations at diagnosis while a high IFN- γ production was expected based on the IFN- γ genotype. Furthermore, IFN- γ genotypes combined with their (low) serum IFN- γ concentrations were found to be predictive of partial clinical remission in patients with new onset T1D patients. It appears that yet unidentified immunoregulatory mechanisms, overrule a pro-inflammatory genotype. This does not disqualify the pro-inflammatory role of the genotype in the pathogenesis of T1D but merely points to an overruling response in the acute phase of active inflammation i.e. at disease manifestation, which needs further investigation.

In a follow up study (**chapter 6**), the relationship between disease progression in T1D, (determined by preserved beta-cell function in the first 6

months after diagnosis) with age, serum IL-10 and IFN- γ cytokines and their genetic correlates was assessed. IL-10 serum levels showed an inverse relationship with age and C-peptide. Increased serum IFN- γ concentrations correlated with rapid disease progression. Genetic variants did not differ between the progression pattern groups, again implying that disease mechanisms override genetic predisposition in the phase of and shortly after disease manifestation.

Lewis who?

Chapter 7 describes the result of a debate over the potential pathophysiological mechanisms in the route to clinical T1D. We stumbled onto a discussion dating back to as early as 1977 when the Lewis blood group was suggested to be associated with T1D.

The various reports in the literature thereafter showed conflicting data for several reasons, one of which was the heterogeneity of the population studied (with consequent indistinct classification of diabetes type). We therefore tried to ascertain whether there was an association between T1D and the Lewis blood group system. In an observational study of approximately 100 known T1D patients, an association between the Lewis blood group phenotype and T1D was confirmed; the effect was more pronounced in females. With reference to the hygiene hypothesis, we presented a possible mechanism, in which the local intestinal environment plays a key role. More specifically: the intestinal microbiotal composition, the intestinal barrier, and the mucosal immune system are of paramount importance. Their relationships are increasingly being recognized in the context of T1D as well as in the genesis of other [immune mediated] diseases.

In **Chapter 8**, the general discussion, the results are summarized and considered in the broader context of T1D whilst a mechanism is suggested to explain first year accelerated growth preceding childhood onset T1D. The main conclusions and considerations based on this thesis are:

- Increased early growth, rather than birth weight, is a risk factor for T1D.
- Accelerated growth preceding T1D is limited to early life i.e. to the 1st year of life.
- From 1 to 4 years of age accelerated growth is observed in later juvenile T1D onset patients in comparison with the general population; this increased growth is not different from their healthy siblings.
- Early in life and in contrast to the INS-VNTR, an IGF1 variant is associated with T1D via accelerated growth.
- A possible combined function of insulin and IGF-I in the pathogenesis towards T1D deserves further investigation.
- Remission or disease progression is at least partially immune-mediated.
- IFN- γ levels, along with their corresponding genotypes, could be valuable in predicting (partial) clinical remission at clinical onset of diabetes.
- T1D disease mechanisms appear to overrule genetic influences in disease progression.
- The gut seemingly plays an important role in T1D pathogenesis, warranting further exploration.
- The added value in disease prediction based on early growth pattern, needs to be established, preferably in a large prospective study, before stratification (based on this early growth pattern) should be considered for future intervention trials of T1D.

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft studies betreffende de klinische relevantie van kandidaat risico genen voor type 1 diabetes. Daarnaast werd een bijdrage geleverd aan de ontrafeling van moleculaire mechanismen van deze genen in de pathogenese van type 1 diabetes. Mogelijk relevante genetische polymorfismen werden gevalideerd en gecorreleerd aan belangrijke klinische fenomenen van type 1 diabetes, te weten vroege groei (INS-VNTR, IGF1, **hoofdstuk 2 t/m 4**), ziekte progressie (remissie) (IFN- γ , IL-10, **hoofdstuk 5 en 6**), beta cel immuniteit (**hoofdstuk 3**) en gen/omgeving interacties (Lewis, **hoofdstuk 7**).

Vroege groei

Hoofdstuk 2 betreft een validatie en uitbreiding van ons eerder onderzoek, waaruit bleek dat pre-diabetische kinderen sneller groeien dan de controle populatie. We bevestigden dat pre-diabetische kinderen sneller groeiden dan hun niet aangedane broertje of zusje. Echter, deze versnelde groei bleek beperkt tot het eerste levensjaar vergeleken met hun broers of zusters. Dit zou kunnen wijzen op het feit dat toegenomen groei na het eerste jaar onafhankelijk is van type 1 diabetes en toegeschreven kan worden aan familiale groeipatronen. Tevens toonden we een correlatie aan tussen leeftijd waarop de diagnose type 1 werd gesteld en verhoogd lichaamsgewicht op 6 maanden.

Hoofdstuk 3 beschrijft een zoektocht naar genetische correlaten voor het fenomeen van vroege versnelde groei voorafgaand aan T1D, zoals gevalideerd in hoofdstuk 2. Wij selecteerden twee bekende genetische markers, beide van belang in zowel groei als T1D. De correlaties tussen de twee genvarianten en versnelde eerstejaars groei, werden bestudeerd in een familie cohort, te weten een IGF1-polymorfisme, zoals eerder beschreven door onze groep, en een insuline promoter polymorfisme (INS-VNTR) dat geassocieerd is met predispositie of protectie tegen T1D. De IGF1-variant was geassocieerd met versnelde groei in het eerste jaar van zowel de patiënten als hun gezonde broers en zussen, maar niet met het ontwikkelen van diabetes, terwijl groei in het eerste jaar niet geassocieerd bleek met de INS-VNTR variant in pre diabetische kinderen, maar wel met ziektegevoeligheid. Deze studie dissocieert dus de bijdrage van genen geassocieerd met groei en ziektegevoeligheid.

Hoofdstuk 4 beschrijft een studie waarin werd gekeken of de bestudeerde metabole genvarianten vergelijkbare functionaliteit bleken te kennen in een populatie welke wordt gekenmerkt door vroege versnelde groei ("inhaalgroei"). Vroege groei werd bestudeerd in een cohort van 250 zeer prematuur (zwangerschapsduur minder dan 32 weken) geboren kinderen. Functionaliteit van de IGF1-variant werd bevestigd, hoewel dit m.n. gold voor de hoofdomtrek. De INS-VNTR variant bleek totaal niet geassocieerd met groei parameters.

Progressie van de ziekte: ziekte remissie oftewel de “honeymoon fase”

De “honeymoon fase”, de fase van (partiële) klinische ziekte remissie, wordt gedefinieerd als de periode waarin vermindering van insuline behoefte ontstaat na initiële behandeling met insuline bij diagnose. Helaas is over deze fase nog relatief weinig bekend en leent deze zich uitstekend ter bestudering van ziekte progressie of (partiële) remissie. Beter inzicht in deze fase is m.n. van belang voor de identificatie van biomarkers geassocieerd met ziekte progressie, als ook voor definitie van ziekteprogressie in relatie tot toekomstige therapeutische interventie mogelijkheden. In hoofdstuk 5 en 6 werd de pathofysiologie van de “honeymoon fase” verder ontrafeld aan de hand van serum cytokine profielen en daarmee corresponderende functionele genpolymorfismen in een internationaal samenwerkingsverband bij nieuw gediagnosticeerde T1D patiënten, in een poging om genetische en functionele immuuncorrelaten te identificeren die associëren met ziekte voortgang.

In Hoofdstuk 5 werd onderzocht of serum- interferon (IFN)- γ [pro inflammatoir, beta cel destructie] of interleukine (IL) -10 [anti inflammatoir, beschermend tegen beta celdestructie] waarden en de bijbehorende functionele polymorfismen geassocieerd waren met ziekte remissie. De patiënten werden 3 maanden gevolgd en ingedeeld naar remissie status. Een opmerkelijke bevinding was dat patiënten die het meest uitgesproken remissie patroon lieten zien, lage concentraties IFN- γ in hun serum vertoonden bij diagnose, in tegenstelling tot een IFN- γ genotype dat juist zou moeten corresponderen met hoge IFN- γ productie. Ziekte mechanismen prevaleren kennelijk boven

genetische aansturing. Verder zagen we dat IFN- γ genotypen, in combinatie met hun (lage) serum IFN- γ concentraties, voorspellend bleken voor [gedeeltelijke] klinische remissie bij nieuw gediagnosticeerde T1D patiënten. Het lijkt of nog niet nader geïdentificeerde, immunoregulatorische mechanismen een proinflammatoir genotype overheersen.

In een vervolg studie (hoofdstuk 6) werd de relatie onderzocht tussen [T1D] ziekte progressie, bèta-cel functie in de eerste 6 maanden na de diagnose, leeftijd, serum IL-10, IFN- γ cytokines en hun genetische correlaten. IL-10 serum concentraties vertoonden een inverse relatie met de leeftijd en het C-peptide. Verhoogde serum concentraties IFN- γ correleerde met een snelle progressie van de ziekte. De genetische polymorfismen verschilden niet tussen de groepen verdeeld in snelheid van ziekte voortgang, hetgeen wederom impliceert dat ziekte mechanismen prevaleren boven genetische aanleg.

Lewis wie?

Hoofdstuk 7 beschrijft het resultaat van een studie over mogelijke pathofysiologische mechanismen in de ontwikkeling van T1D in relatie tot interacties met gen en omgeving. Aan de basis hiervan staat de bevinding uit 1977, waarin een contro-versiële associatie tussen de Lewis bloedgroep en T1D wordt beschreven. Deze tegenstrijdigheid kent meerdere redenen, waaronder de subclassificatie van diabetes. Wij stelden ons daarom de vraag of er sprake was van een associatie tussen T1D en het Lewis bloedgroepen systeem. In een observationele studie van ongeveer 100 bekende T1D patiënten vonden we inderdaad een associatie tussen (lagere) prevalentie van een specifiek Lewis bloedgroeotype en T1D, met name bij vrouwen. De hygiëne hypothese overwegend, stelde

we voor dat een mogelijk mechanisme voor deze bevinding gevonden zou kunnen worden in het intestinale milieu, specifiek: de intestinale microbiotische samenstelling, de intestinale barrière en het mucosale immuunsysteem. Het belang van dit milieu wordt inmiddels in toenemende mate erkend, zowel in de context van diabetes als in de genese van andere [immuun gemedieerde] ziekten.

In de algemene discussie (**Hoofdstuk 8**), worden de resultaten van dit proefschrift samengevat en in de bredere context van type 1 diabetes geplaatst. Een mechanisme wordt geopperd aangaande onze bevindingen van versnelde groei in het eerste levensjaar voorafgaand aan de klinische diagnose van juveniele type 1 diabetes. De belangrijkste conclusies en interpretaties van dit proefschrift zijn:

- Vroege versnelde groei, maar niet geboortegewicht, is een risico factor voor T1D.
- Versnelde groei voorafgaand aan T1D is beperkt tot het eerste levensjaar in juveniele T1D.
- In de periode vanaf het eerste jaar tot de leeftijd van 4 jaar is er weliswaar een versnelde groei aantoonbaar bij kinderen die later T1D zullen ontwikkelen ten opzichte van de algemene bevolking, maar deze is niet verschillend dan die gevonden bij gezonde broers en zussen van deze latere T1D patiënten.
- Vroeg in het leven spelen IGF-I en insuline hoogstwaarschijnlijk een belangrijke rol in de pathogenese van T1D
- Een IGF1 gen polymorfisme is indirect geassocieerd met T1D via vroege versnelde groei.
- Remissie danwel ziekte progressie in T1D is tenminste gedeeltelijk immuun gemedieerd.
- IFN- γ serum spiegels in combinatie met de corresponderende genotypen kunnen waardevol blijken bij voorspelling van ziekte remissie bij de diagnose T1D.
- Genetische invloed lijkt regelmatig, door nog onbekende ziekte mechanismen, te worden genivelleerd o.a. bij T1D ziekte voortgang (remissie).
- Het belang van het intestinaal systeem in pathogenese van T1D rechtvaardigt verdere exploratie.
- Stratificatie gebaseerd op vroege groei patronen zou pas overwogen moeten worden als additionele parameter in toekomstige interventie studies van T1D, nadat er, bij voorkeur prospectief, is aangetoond dat er sprake is van een daadwerkelijk meerwaarde in ziekte voorspelling o.b.v. deze vroege groeipatronen.

